

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Ivona Štangl

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Hortikultura

**Indukcija kalusa iz nezrelog embrija pšenice**

Završni rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Ivona Štangel

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivrede

Smjer Hortikultura

## **Indukcija kalusa iz nezrelog embrija pšenice**

Završni rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu završnog rada:

1. izv.prof.dr.sc. Sonja Petrović, mentor
2. prof.dr.sc. Sonja Vila, član
3. doc.dr.sc. Monika Tkalec Kojić, član

Osijek, 2019.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Završni rad

Fakultet agrobiotehničkih znanosti u Osijeku

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda, smjer Hortikultura

Ivona Štangl

### **Indukcija kalusa iz nezrelog embrija pšenice**

**Sadržaj:** Pšenica je najznačajnija zrnata žitarica za prehranu. U ovom se radu iz pšenice izvadio nezreli embrij, 10-14 dana nakon oprašivanja. Inducirao se na pripremljenom mediju in vitro. Glavni cilj je bio istražiti da li je moguća klijavost i u kojoj količini. Pokazalo se iznimno važnim imati sterilne uvjete rada, pravilnu hranjivu podlogu, te povoljne uvjete svjetlosti i temperature za rast i razvoj kalusa. Svrha pokusa je optimizirati genotip na stresne uvjete abiotičkog i biotičkog podrijetla. Frekvencija indukcija kalusa ispitivanih sorata varirala je od 50% do 83%.

**Ključne riječi:** indukcija, kalus, nezreli embrij, pšenica

22 stranice, 3 tablice, 24 slike, 22 literaturna navoda

Završni rad je pohranjen u Knjižnici Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek i u digitalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

BscThesis

Faculty of agrobiotechnical science Osijek

Undergraduate university study Agriculture, course Plant production

Ivona Štangl

### **Callus induction from immature embryos wheat cultivars**

**Summary:** wheat is the most important grain for nutrition. In this work, wheat was removed by an immature embryo, 10-14 days after pollination. Induced on the prepared medium in vitro. The main aim was to investigate whether and how much germability was possible. It has proven to be extremely important to work in sterile conditions, a proper nutrient base, and optimal light and temperature conditions for the growth and development callus. The main purpose is to optimize the genotype to the stressful conditions of abiotic and biotic conditions. Callus induction frequency among wheat cultivars varied from 50% to 83%.

**Keywords:** induction, callus, immature embryo, wheat

22 page, 3 tables, 24 figures, 22 references

BSc Thesis is archived in Library of Faculty of agrobiotechnical sciences Osijek and in digital repository of Faculty of agrobiotechnical sciences Osijek

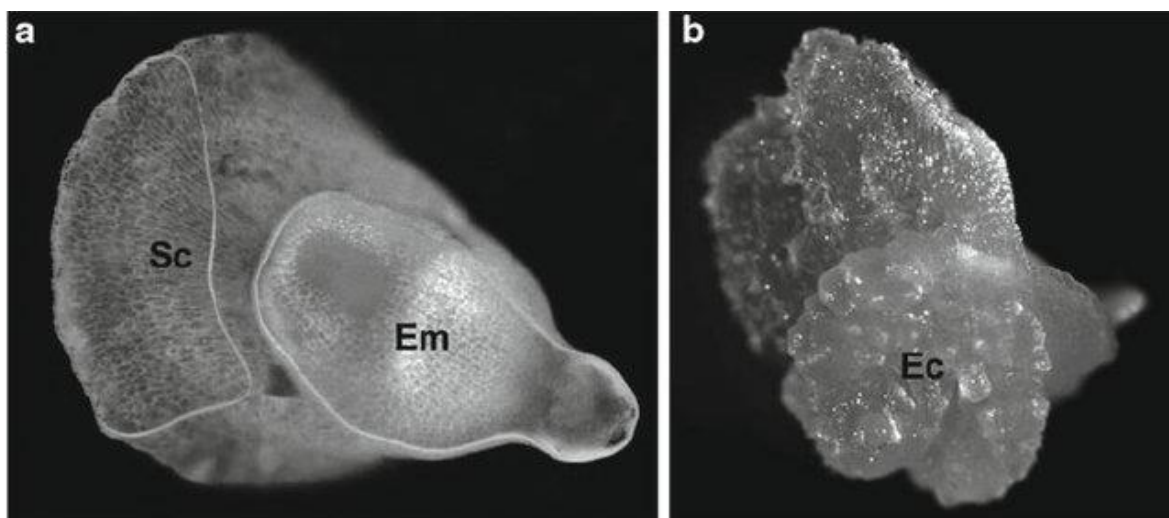
## **SADRŽAJ**

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Izbor sorata pšenice.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Laboratorijska oprema.....</b>	<b>4</b>
<b>2.3. Sterilizacija zelenog sjemena .....</b>	<b>5</b>
<b>2.4. Hranidbena podloga (medij).....</b>	<b>8</b>
<b>2.5. Postupak eksplantacije embrija iz zrna.....</b>	<b>9</b>
<b>3. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>11</b>
<b>4. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>20</b>
<b>5. POPIS LITERATURE.....</b>	<b>21</b>

## 1. UVOD

Pšenica je jednogodišnja biljka koja pripada rodu *Triticum*, porodici trava s klasastim krupnim cvatom koji se sastoji od pojedinačnih klasića sastavljenih od 3 do 7 cvjetova. Najznačajniji ratarski usjev i jedna je od najrasprostranjenijih žitarica u svijetu, a prema ukupnim zasijanim površinama je na prvom mjestu. Pšenicom je zasijano blizu jedne četvrtine svjetske obradive površine, a uzgaja se na svim kontinentima. Nezamjenjiva je u ishrani ljudi kao glavna krušarica te je izvor jednog od osnovnih prehrambenih proizvoda u prehrani ljudi – kruha i sličnih proizvoda. Pšenica je izuzetno značajna u mlinarstvu, prerađivačko-prehrambenoj industriji, farmaceutskoj industriji i proizvodnji stočne hrane za koju se koriste sporedni proizvodi meljave pšeničnog zrna. Najveći proizvođači pšenice su Kina, SAD, Indija, Rusija, Kanada i Francuska, dok se najviši prinosi (iznad 7,0 t/ha) ostvaruju uglavnom u europskim zemljama. Prosječan prinos pšenice u Hrvatskoj je oko 4,5 t/ha, a uzgaja se na prosječno 180 000 ha (Kovačević i Rastija, 2014.). Zbog iznimne važnosti pšenice rade se oplemenjivanja na otpornost na abiotičke (polijeganje, niske temperature, suša, toksičnost aluminija) i biotičke (hrđe, snijeti, pepelnica, kukci) stresove. Zbog toga pokušavaju se stvoriti novi genotipovi koji bi imali visoku produktivnost i u stresnim uvjetima uzgoja. Posljednjih se dvadesetak godina izuzetno razvila i napredovala kultura tkiva i stanica viših biljaka. U istraživanjima širom svijeta razvijaju se kulture tkiva *in vitro*, na sterilnim hranidbenim podlogama, kulture embrija, vegetacijskih izdanaka i meristema, tkiva, stanica i protoplasta u kojima se regeneriraju dijelovi biljke mnogih vrsta. Kultura biljnog tkiva *in vitro* do sada je jedina doista djelotvorna tehnika kojom se iz zaraženih biljaka mogu dobiti zdrave biljke oslobođene od virusa (Jelaska, 1994.). Biljni materijal koji se uzima za pokuse može sam po sebi (jednako kao hranidbena podloga i fizikalni faktori rasta) utjecati na rast i razvitak u uvjetima *in vitro*. Uspješnost kulture ovisit će o značajkama biljke-davatelja, uvjetima u kojima je biljka rasla te o postupcima prije uvođenja eksplantata u kulturu *in vitro* (Pierik (1987.), prema Jelaska, 1994.). Indukcija uzrokuje inicijaciju biljnih struktura, organa ili procesa. Eksplantant koji se najčešće koristi za indukciju kalusa je nezreli dio. Mlađa, embrijska tkiva obično imaju visoki kapacitet za regeneraciju; npr. kod žitarica se pretežno upotrebljavaju embriji i sjemenke za eksperimentalni materijal u kulturi tkiva (slika 1). Kako biljka postaje starija, njezin se kapacitet za regeneraciju smanjuje pa se dijelovi i tkiva juvenilnih (mladih) biljaka češće upotrebljavaju nego tkiva odraslih biljaka, posebno kada je riječ o grmlju ili drveću. Mlado i neodrvnjelo tkivo općenito je prikladnije za kulturu od starijega,

drvenastog tkiva, iako ima i mnogo izuzetaka koji su objavljeni u brojnim člancima (Jelaska, 1994.). Nezreli embrij je teško dobiti tokom cijele godine i vrijeme kada se može uzeti je strogo ograničeno. Dužina razdoblja ovisi o genotipu, potrebno je da je endosperm još uvijek relativno tekući. Kultura pšeničnog tkiva potpuno ovisi o sastavu medija (Fennell i sur., 1996.) i izvoru eksplantata (Zhang i Seilleur, 1987.) (prema, Jelaska, 1994.). Ako je biljka snažna i zdrava u trenutku izolacije eksplantata ima više izgleda da će kultura in vitro biti uspješna. Ako se eksplantati izabiru iz klonske populacije jedinki, onda se za eksperimentalni materijal moraju upotrijebiti najzdraviji primjerci, jer i to utječe na učestalost infekcije nakon izolacije (Jelaska, 1994.). Prema tome, za uspostavljanje pouzdane kulture tkiva poželjni su protokoli za indukciju kalusa jer svi genotipovi imaju različit odgovor na kulturu tkiva. Usvajanje novih tehnika kao što je indukcija kalusa mogu olakšati povećanje proizvodnje žitarica i povećati njihovu prehrambenu vrijednost. Glavni cilj ovog istraživanja je utvrditi postotak klijavosti indukcijom kalusa iz nezrelog embrija kao eksplantata.



Slika 1. Nezreli embrij (a) i embriogenski kalus (b) pšenice (Sc scutellum, Em embryo, Ec embryogenic callus.) (izvor: Gils i sur., 2012.)

## **2. MATERIJAL I METODE**

### **2.1. Izbor sorata pšenice**

U pokusu su korištena četiri genotipa ozime pšenice dobivenih iz gen kolekcije Katedre za genetiku, oplemenjivanje bilja i sjemenarstvo prikupljenih na pokušalištu „Klisa“ Fakulteta Agrobiotehničkih znanosti Osijek. Korištene su dvije hrvatske sorte Superžitarka i Srpanjka, te dvije austrijske sorte Achat i linija Y0758583.

Super Žitarka je ozima srednje-rana sorta pšenice te ima prosječnu visinu stabljike od 73 cm. Svrstava se u visokorodnu i kvalitetnu sortu s genetskim potencijalom rodosti većem od 10 t/ha. Njene glavne karakteristike su da ima dobru toleranciju na bolesti ozime pšenice, kao što su simptomi smeđe pjegavosti (Septoria), te značajno manje žute hrđe (<https://www.poljinos.hr/>).

Srpanjka je rana ozima pšenica kreirana na Poljoprivrednom institutu Osijek, vrlo niske stabljike, oko 64 cm te vrlo dobre tolerantnosti na polijeganje. Glavne karakteristike su ranozrelost (datum klasanja je u prosjeku oko 1. svibnja), stabilna, visokorodna sorta s genetskim potencijalom prinosa također većem od 10 t/ha. Sorta Srpanjka je tolerantna na niske temperature i na većinu bolesti, a time u prosjeku ostvaruje visoke i stabilne urode zrna (<https://www.poljinos.hr/>).

Achat je Austrijska sorta pšenice kreirana u Probstdorfer Saatzucht Gesellschaft mbH, Austrija. Pripada među sorte koje imaju srednje visoku do visoku stabljiku, kasnijega datuma klasanja te odlične otpornosti na zimu. Osim umjerene otpornosti na septoriju sorta Achat pripada među vrlo kvalitete sorte s visokim sadržajem proteina (<http://biosorten.de>).

Linija ozime pšenice Y0758583 je također kreirana u Probstdorfer Saatzucht Gesellschaft mbH, Austrija. Odabir sorata se temeljio na datumu klasanja i cvjetanja s obzirom na zahtjeve u protokolu za odabir eksplantata, te su tako odabrane dvije rane i dvije kasne sorte (Tablica 1).

S obzirom na protokole za eksplantaciju embrija bilo je potrebno prikupiti zelene klasove odabranih genotipova pšenice. Prije prikupljanja tijekom svibnja se obilazilo pokusno polje u svrhu određivanja datuma klasanja i datuma cvjetanja te datuma žetve klasova (Tablica 1). Žetva klasova svakog pojedinog genotipa je provedena u dva navrata 30.5. i 14.6., nakon čega su klasovi odneseni u laboratorij u svrhu daljnjeg postupka.

Tablica 1. Popis sorata, datumi klasanja, cvjetanja i žetve klasova.

Sorta	Datum klasanja	Datum cvjetanja	Datum žetve
<b>Super Žitarka</b>	5. svibnja, 2019.	15. svibnja, 2019.	30. svibnja, 2019.
<b>Srpanjka</b>	1. svibnja, 2019.	11. svibnja, 2019.	30. svibnja, 2019.
<b>Achat</b>	19. svibnja, 2019.	28. svibnja, 2019.	14. lipnja, 2019.
<b>Y0758583</b>	15. svibnja, 2019.	27. svibnja, 2019.	14. lipnja, 2019.

## 2.2. Laboratorijska oprema

Izvođenje pokusa se mora obaviti u strogo sterilnim uvjetima. Uz osobnu higijenu potrebno je nositi i rukavice te zaštitnu kutu. Potrebna oprema za pripremu hranidbene podloge je vaga za mjerenje tvari u gramima, precizna vaga za mjerenje u miligramima, pH-metar, epruvete, tikvice, bočice, autoklav – uređaj za sterilizaciju vrućom parom i povišenim tlakom (Slika 2), te prostor za čuvanje pripremljene hranidbene podloge, sterilne vode i sl. Za vađenje sjemena i izolaciju embrija na hranjivu podlogu, bilo je potrebno očistiti površine stola s 96%-tnim alkoholom. Instrumenti koji su se koristili, poput pinceta su bili uronjeni u 96%-tnom alkoholu i nakon toga sterilizirani na kvarcnom sterilizatoru pri temperaturi od 250°C. Proces eksplantacije embrija u pokusu izveden je u komori „laminar air-flow cabinet“ u kojoj struji sterilni zrak kako ne bi došlo do kontaminacije (Slika 3).



Slika 2. Autoklav



Slika 3. Laminar (air-flow) cabinet

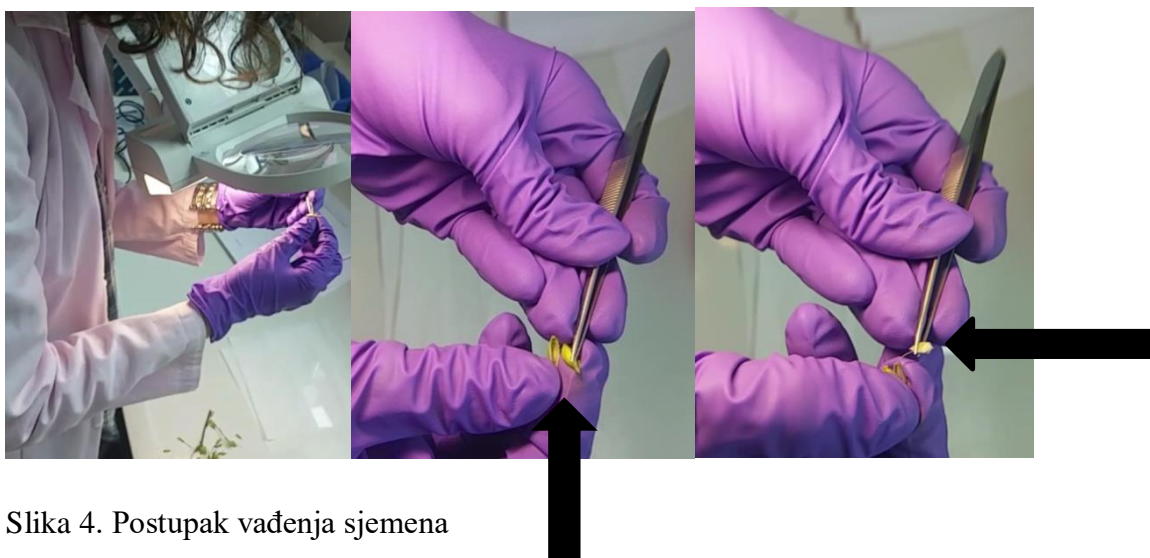
(foto original: I. Štangl)



### 2.3. Sterilizacija zelenog sjemena

U istraživanju je korišten zdrav biljni materijal bez vidljivih naznaka bolesti. Iz obuvenca i košuljice se vrlo pažljivo izvadilo sjeme (Slika 4). Faza formiranja zrna pšenice traje u prosjeku 20 dana. Sjeme je stoga bilo potrebno prikupiti 15-20 dana nakon oprašivanja (Slika 5). Sazrijevanje zrna se odvija u nekoliko faza: mliječna zrioba (sjeme je mliječne konzistencije), tjestasto stanje, voštana zrioba i puna zrioba. S napredovanjem sazrijevanja prema punoj zriobi smanjuje se vlažnost zrna, povećava udio suhe tvari u zrnu. Nalijevanje zrna obično traje 16-22 dana i najintenzivnije je u mliječnoj zriobi i tjestastom stanju zrna, a završava kada se vlažnost spusti na oko 40 %.

Idealno razdoblje za vađenje nezrelog embrija je srednje-kasno mliječni stupanj s ulaskom u ranu fazu tijesta. Odnos vode i suhe tvari u ukupnoj masi sjemena postupno se mijenja od formiranja do pune zriobe i to tako da se približavanjem zriobi povećava udjel suhe tvari, a smanjuje udjel vode. Opadanje vlažnosti sjemena u fazama sazrijevanja je u sljedećim okvirima: od 80% do 65% (formiranje sjemena), 62-60%, 62-52% i 52-50% (početak, sredina i kraj mliječne zriobe), 50-40% (tjestasto stanje), 40-35%, 32-25% i 25-20% (početak, sredina i kraj voštane zriobe) i ispod 20% (puna zrioba) (Kovačević i Rastija, 2014.). Pod pritiskom zrno treba biti mekano, lako se zgnječiti, a pri tome iz njega treba izaći bijeli zgusnuti sok. Faza traje od 10 do 12 dana.



Slika 4. Postupak vađenja sjemena

(Izvor: foto original I. Štangl)



Slika 5. Očišćeno sjeme sorte Srpanjka

(Izvor: foto original I. Štangl)

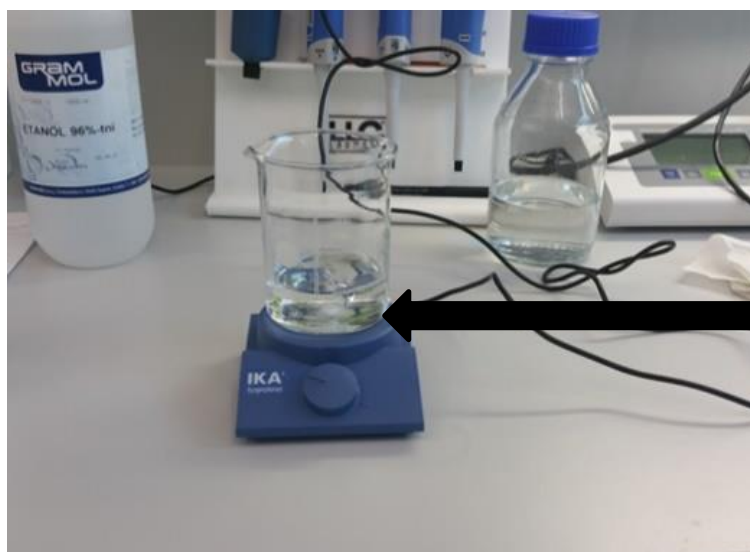
Istraživanje je obavljeno prema protokolu preuzetog iz udžbenika Preparation of Plant Material for Cell, Tissue, and Organ Culture (Applied Biotechnology Center, 1999.). Zeleno sjeme je uklonjeno iz glave sjemena i površinski sterilizirano uranjanjem u 70% etanol na 40 sekundi. Pripravljena je otopina od 20% Clorox-a (3% NaCl). Clorax je komercijalno sredstvo za izbjeljivanje, blanširanje. Služi kao sredstvo koje čini stvari bijelim ili bezbojnim. Uliveno je u posudu 100 ml Clorax-a s dodatkom 10 kapi Tween 80, zatim napunjeno do 500 ml deionizirane vode. Tween 80 je drugi naziv za Polisorbat 80. Polisorbat 80 je izveden iz polietoksiliranog sorbitana i oleinske kiseline. U ovom postupku uloga mu je bila sterilizacija sjemena. Cijela otopina je ulivena u 1 L posudu s magnetnim štapićem (Slika 6.).



Slika 6. Priprema 20% otopine Clorax-a

(Izvor: foto original I. Štangl)

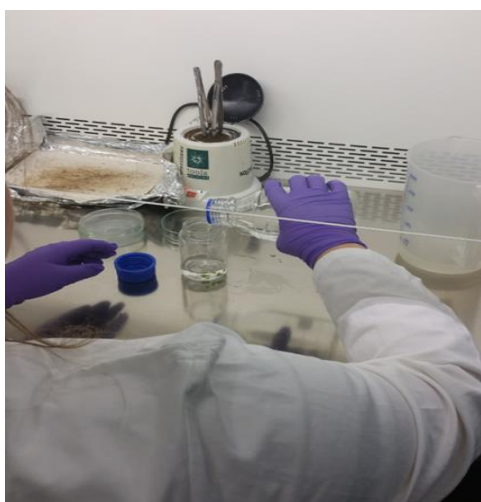
Potom je sjeme stavljeno u otopinu Clorax-a, a otopina je stavljena na magnetnu miješalicu kako bi bio proveden postupak sterilizacije. Potrebno na magnetnoj miješalici ostaviti na 30 minuta (Slika 7.)



Slika 7. Sterilizacija sjemena

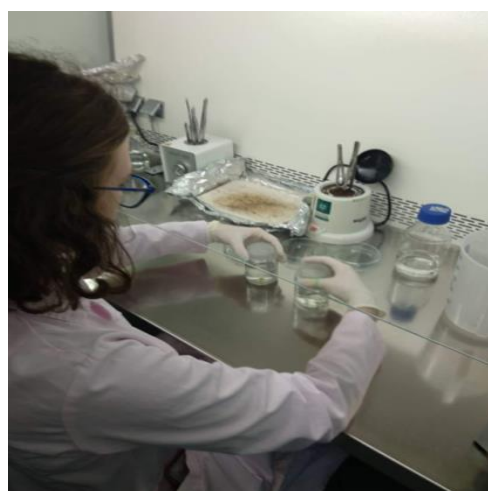
(Izvor: foto original I. Štangl)

U autoklavu je priređena jedna sterilizirana čaša za izlivanje, staklene petrijeve zdjelice i dvije Erlenmeyerove boce koje sadrže destiliranu vodu. Otopina je izlivena kroz cjedilo. Provedena su 3 ispiranja sjemena u trajanju od 5 minuta (Slika 8). Tijekom ispiranja bilo je potrebno konstantno miješanje (Slika 9.)



Slika 8. Postupak ispiranja sjemena

(Izvor: foto original I. Štangl)



Slika 9. Postupak miješanja sjemena

(Izvor: foto original I. Štangl)

## 2.4. Hranidbena podloga (medij)

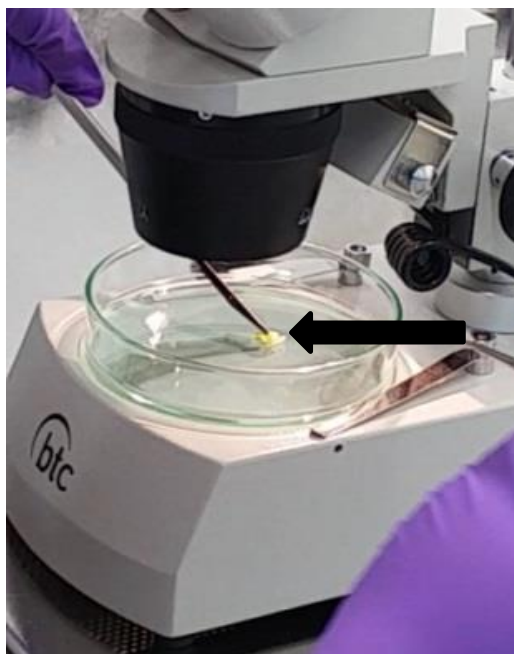
Sastav medija odlučujući je za rast. Bez obzira na različitosti hranidbenih podloga koje se danas upotrebljavaju sve one sadrže mineralne soli, ugljikohidrate kao izvor energije, vitamine i regulatore rasta. Za pripremu hranidbene podloge potrebni su vrlo čisto posuđe, voda visoke čistoće i pažljivo mjerenje svih komponenata podloge. Glavne sastavne dijelove hranidbene podloge za kulturu biljnih stanica mogu se svrstati u pet glavnih skupina: anorganske soli, ugljikohidrati, vitamini, regulatori rasta i organski dodaci. Anorganska hranjiva sastoje se od mineralnih soli koje u većini kultura zadovoljavaju potrebe za makroelementima i mikroelementima. Ugljikohidrati služe u podlozi kao izvor energije. Od vitamina koji se dodaju hranidbenim podlogama su B1 ili tiamin (u obliku droklorida) doista prijeko potrebni za kulturu biljnih stanica, jer ga one ne mogu sintetizirati u potrebnoj količini. Od regulatora rasta stvaranje kalusa bit će u većini slučajeva postignuto dodavanjem 2,4-Diklorofenoksioktene kiseline ili 2,4D (Jelaska, 1994.)

Tablica 2. Medij za formulaciju kalusa iz embrija pšenice prema T. Murashige and F. Skoog. 1962.

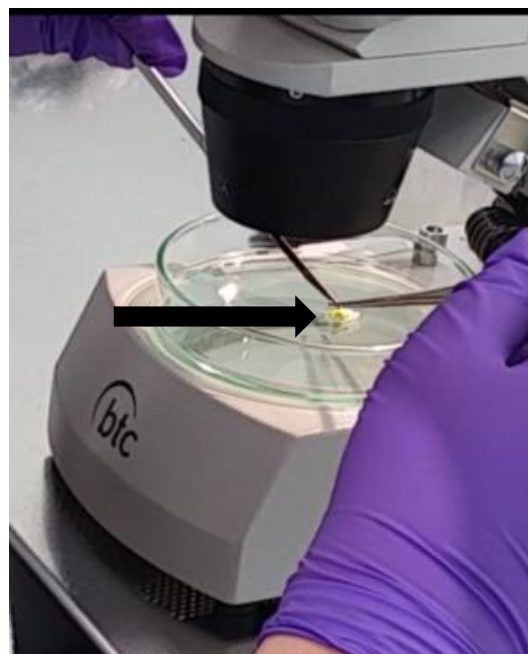
Komponente	500 ml	1000 ml	2000 ml	3000 ml
MS makroelementi (10x)	100 ml	200 ml	400 ml	600 ml
MS mikroelementi (10x)	50 ml	100 ml	200 ml	300 ml
MS vitamini (1000x)	0,5 ml	1 ml	2 ml	3 ml
Tiamin Cl	0,020 mg	0,040 mg	0,080 mg	0,120 mg
L-Asparagine	0,075 g	0,150 g	0,300 g	0,450 g
Saharoza	30 g	60 g	120 g	180 g
2,4 D (mg/ml)	1,75 ml	2,5 ml	5.0 ml	7,5 ml
Agar	4 g	8 g	16 g	24 g

## 2.5 Postupak eksplantacije embrija iz sjemena pšenice

Na području za seciranje na mikroskopu u sterilnim uvjetima na laminaru postavljena je jedna Petrijeva zdjelica. Sjeme se držalo u Petrijevoj zdjelici kako bi se izolirao embrij i smanjila mogućnost kontaminacije. Svrha mikroskopa je lakši pronalazak embrija. Sjemenka je izrezana skalpelom (Slika 10). Nakon toga, endosperm i embrij se izvade iz sjemena uz pomoć skalpela i pincete (Slika 11).



Slika 10. Zarezivanje sjemena skalpelom

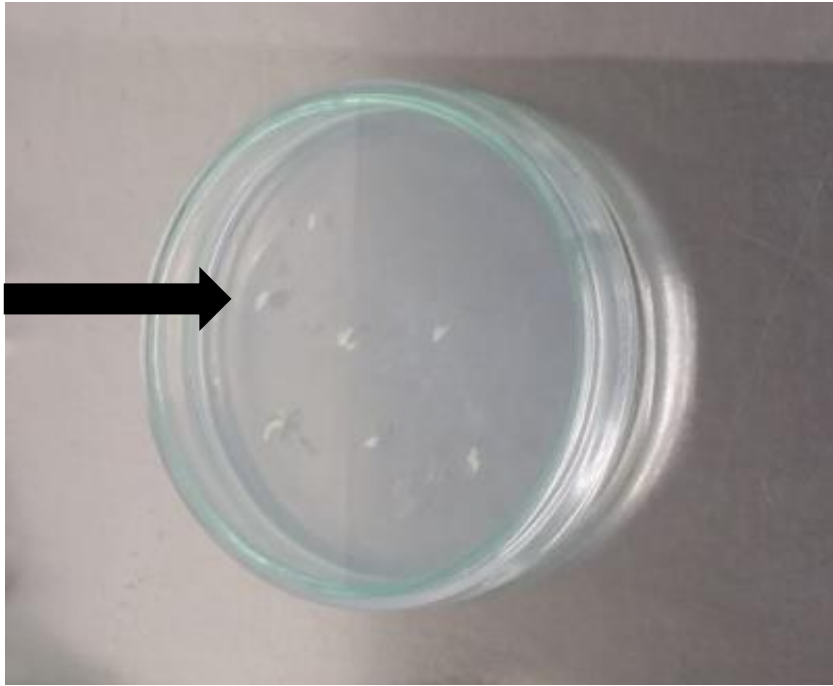


Slika 11. Eksplantacija embrija

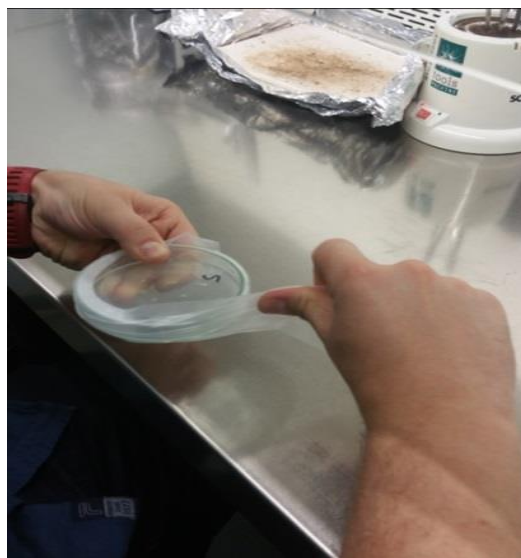
(Izvor: foto I. Štangl)

Eksplantirani embrij je stavljen na pripremljeni medij s potpornom stranom prema gore, a strana gdje je embrij je na kontaktu s medijem (Slika 12.) Postavljeni su embriji u medij u Petrijeve zdjelice od 6 cm pripremljene s 10 ml medija. Petrijeva zdjelica je potom omotana parafilmom kako ne bi došlo do kontaminacije (Slika 13.)

Na kraju Petrijevu zdjelicu je bilo potrebno omotati aluminijskom folijom kako bi se onemogućio izvor svjetlosti.



Slika 12. Embriji stavljeni na hranjivu podlogu  
(Izvor: foto original I. Štangl)



Slika 13. Omotavanje parafilmom  
(Izvor: foto original I. Štangl)

Eksplantirani embriji su prema protokolu inkubirani na temperaturi od 23°C u sobi za kulturu rasta na 4-5 tjedana.

### 3. REZULTATI I RASPRAVA

Prvi znakovi induciranja embrija bili su već nekoliko dana nakon inokulacije. Nakon tri tjedna razvili su se kalusi. Frekvencija klausa odabranih sorti je varirala između 50% i 83% (Tablica 3).

Frekvencija indukcije kalusa izračunata je prema formuli:

$$\text{učestalost indukcije kalusa \%} = \frac{\text{broj sjemenki koje proizvode kalus}}{\text{broj kultiviranih sjemenki}} \times 100$$

Tablica 3. Frekvencije indukcije kalusa u ispitivanim sortama i linijama

Sorta	Klijavost (%)
Superžitarka	50
Srpanjka	72
Achat	83
Y0758583	83

Od 12 nezrelih embrija stavljenih na hranjivu podlogu za sortu Super Žitarka, njih 6 je uspješno inducirano. U Srpanjke je od postavljenih embrija 11, uspješno inducirano njih 7. Prilikom izvođenja pokusa jedan je embrij kontaminiran bakterijom (loša sterilizacija eksplantata ili nepažanja prilikom vađenja embrija i stavljanja na hranjivu podlogu). Kontaminacija može predstavljati opasnost od zaraze za ostale embrije koje se nalaze u tome mediju. Kod sorte Achat i linije Y0758583 stavljena su 6 embrija na medij i oba su imale 5 induciranih kalusa (Tablica 3.)

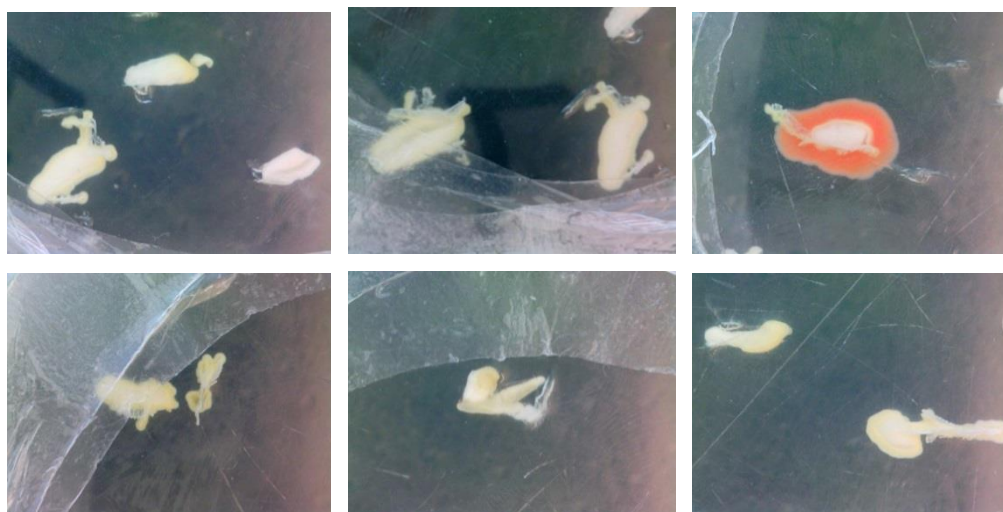
Indukcija kalusa između četiri genotipa je podjednaka i nema većih odstupanja. S obzirom da su bili u jednakim uvjetima svjetlosti, temperature, te istoj hranjivoj podlozi, uvjeti podloge su bolje odgovarali Austrijskom genotipu pšenice. Također, izgled i boja samog kalusa je drugačija za oba genotipa.



Hrvatske sorte Super Žitarka i Srpanjka su karakterizirane više blijedom bojom i glatki su, manjeg promjera (Slika 14 i 15), dok su Austrijske sorta Achat i linija Y0758583 karakterizirane više smečkastom bojom, te su krupnijeg promjera (Slika 16 i 17).

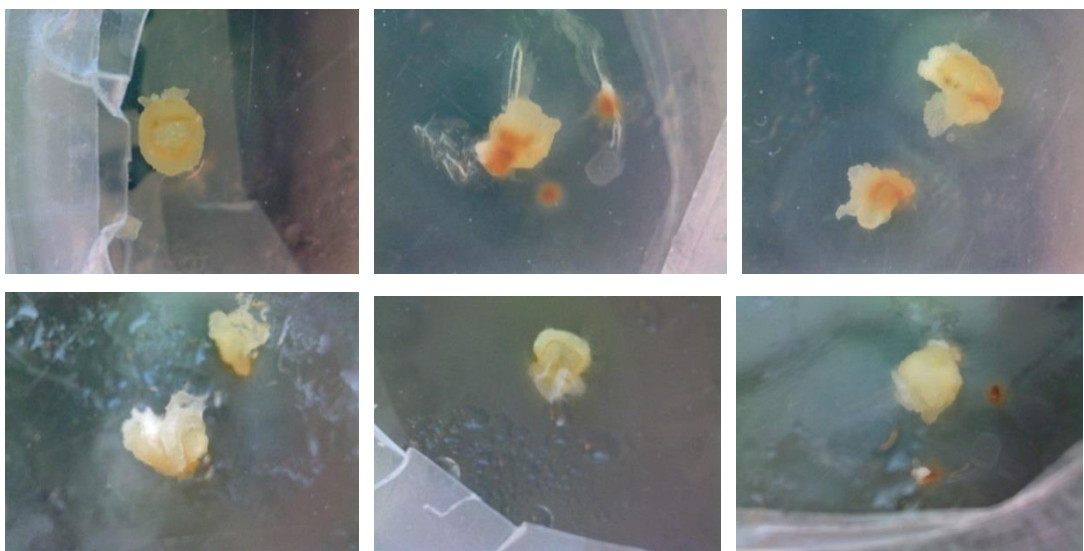


Slika 14. Mikroskopski prikaz indukcije kalusa sorte Super Žitarka  
(Izvor: foto original D. Bošnjak)



Slika 15. Mikroskopski prikaz indukcije kalusa sorte Srpanjka  
(Izvor: foto original D. Bošnjak)

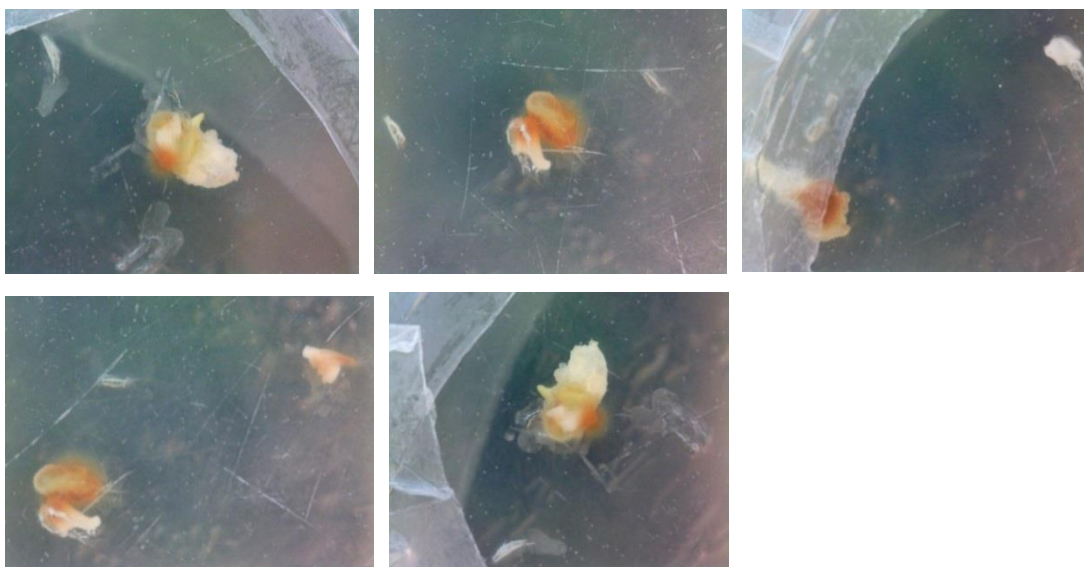




Slika 16. Mikroskopski prikaz indukcije kalusa linije Y0758583

(Izvor: foto original D. Bošnjak)

Visoki rezultati kalusiranja potvrda su rezultatima iz prijašnjih provedenih istraživanja od 87% (Kereša i sur., 2004.), te 83%, 85% i 90% (Lqbal, 2016.).

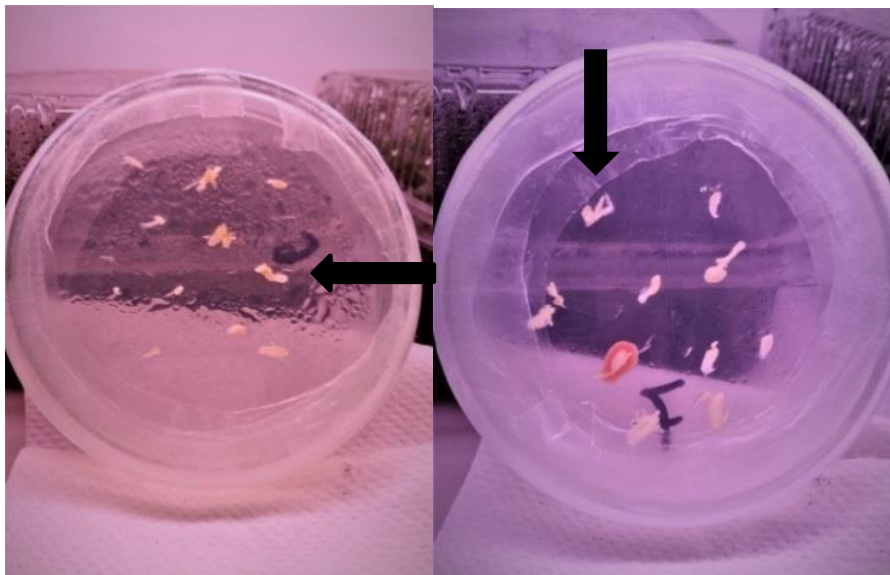


Slika 17. Mikroskopski prikaz indukcije kalusa sorte Achat

(Izvor: foto original D. Bošnjak)

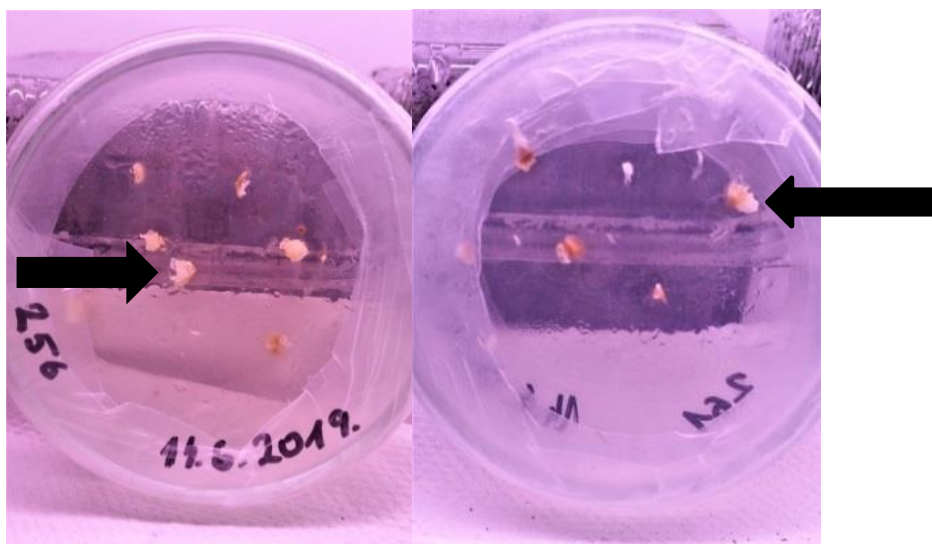
Kрупniji embriji su imali bržu i veću indukciju od sitnijih (Slika 18 i 19). Treba napomenuti da istraživanje vezana za nastanak kalusa imaju značajne učinke i na druga

područja same biologije biljke jer se bavi važnim pitanjima, na primjer kako višestanični organizmi percipiraju i pretvaraju endogene i okolišne signale i kako potiču ili održavaju diferencijaciju/dediferencijaciju stanica.



Slika 18. Prikaz rezultata indukcije kalusa sorata Super Žitarka (lijevo), te Srpanjka (desno)

(Izvor: foto original I. Štangl)



Slika 19. Prikaz rezultata indukcije kalusa linije Y0758583 (lijevo), te sorte Achat (desno)

(Izvor: foto original I. Štangl)

Formiranje kalusa je pod genetskom regulacijom, a time i molekularno razumijevanje ovog procesa je u osnovi uspješne generacije propagacijskog materijala i/ili uvođenje genetskih

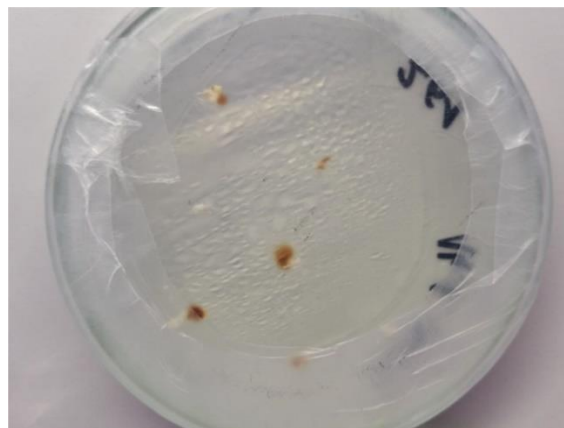
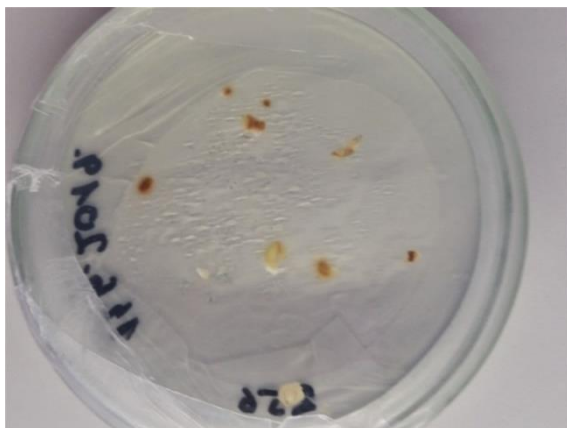
elemenata u eksperimentalne ili industrijske promjene. Kalus nastaje u biljkama kroz stanično reprogramiranje parenhimskih stanica, vodeći do neorganizirane amorfne mase stanica koje se brzo dijele.

Indukcija kalusa pokreće varijacije u endogenim razinama biljnih hormona koje se javljaju kao odgovor na fizičke ili kemijske podražaje. Postoji nekoliko regulatornih puteva koje vode do staničnog reprogramiranja, uključujući put na bazi citokinina, auksina i putem rane. Stanično reprogramiranje uzrokovano ranom može nastati zbog bakterijskih, virusnih i/ili napadom insekta. Štoviše, tvorba kalusa u biljkama ima slične anatomske i fiziološke značajke s formacijom humanog tumora, ističući vrijednost razumijevanja temeljnih mehanizama formiranja kalusa. Pored toga, indentifikacija gena ili regulatornih elemenata, također bi mogla dati uvid u nekontroliranu proliferaciju stanične diobe u mnogim organizmima, uključujući stvaranje tumora (Tuskan i sur., 2018.)

U istraživanju Lqbal (2016.), utvrđeno je da kod indukcije kalusa temperatura utječe na rast. Na temperaturama između 20 i 27°C, najbolji rezultati su bili na temperaturi 24°C. Dobri rezultati su postignuti na 22, 23, 25 i 26°C. Dok je prolaznost bila vidljiva na 22 i 27°C, slab rezultat je postignut pri temperaturi od 20°C. U tom istraživanju se također navodi kako je kalus koji je bio u osvijetljenim uvjetima rasta formirao zlatno-smeđi kalus 14 dana nakon inokulacije, dok je uzorak uzgajan u mraku imao formiran žućkasto-bijeli kalus.

U daljnjim istraživanjima treba se obratiti veća pažnja na uvjete svjetlosti i temperature tokom indukcije. Obje Austrijske sorte su par dana nakon inokulacije bile prekrivene smeđom bojom što ukazuje na pojavu oksidacije fenola (Slika 19 i 20).

Fenol je slabije topljiv u vodi, a dobro se otapa u alkoholu, eteru i benzenu. Međutim, fenol ne ubija samo nepoželjne mikroorganizme – ubija i sve tipove stanica. Jedna je od glavnih razlika između fenola i alkohola da su u vodenoj otopini fenoli slabe kiseline, dok su alkoholi neutralni. Benzenski prsten fenola lako se oksidira. Fenoli s jakim bazama reakcijom neutralizacije daju sol i vodu, dok sa slabim bazama ne reagiraju. Fenoli su lako podložni oksidaciji. Naime, slobodni radikali lakše odcjepljuju vodikov atom skupine –OH fenola, čime nastaje razmjerno stabilan fenoksilni radikal (Amić, 2008).

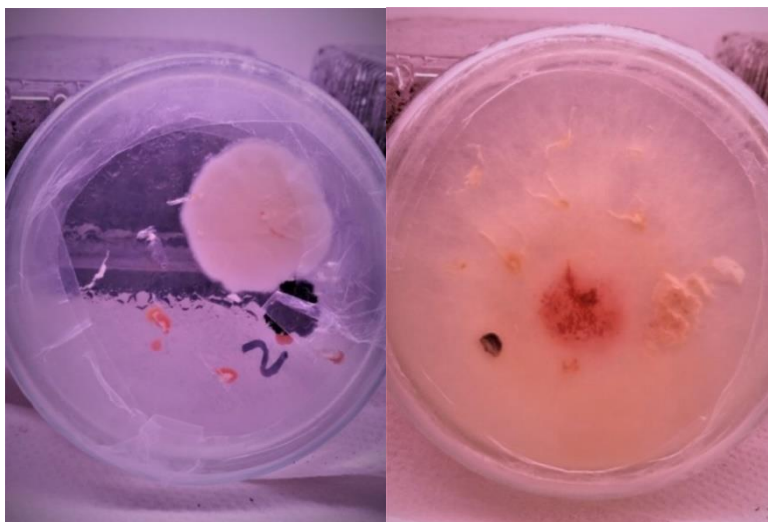


Slika 20. Fenolna oksidacija linije Y0758583 Slika 21. Fenolna oksidacija sorte Achat  
(Izvor: foto original I. Štangl)

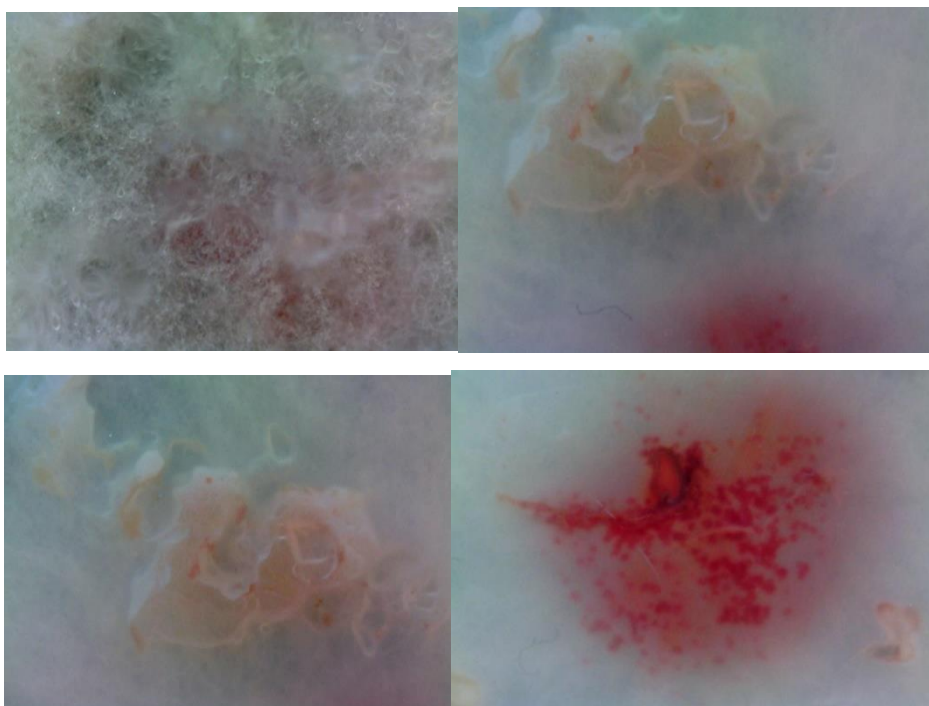
Nadalje, rezultati su pokazali iznimnu važnost od čistoga prostora do važnosti sterilizacije objekta, predmeta koji se koriste, kao i samog sjemena. Mogućnost kontaminacije je visoka. Znatno broj tipova biljnih vrsta i kultura *in vitro* koji još nisu rutinski razvijeni uzrokovano je njihovim gubitkom zbog kontaminacije mikroorganizmima. Mikroorganizmi koji onečišćuju kulture biljnog tkiva uključuju viruse, bakterije, kvasce i gljivice. Kulture mogu biti onečišćene i crvićima, resokrilcima i crvenim paukom. Onečišćenje bakterijama smatra se najozbiljnijom i razmotreno je u literaturi. Rjeđe je opisano o kontaminaciji kvascima i gljivicama i o njihovom djelovanju na rast biljčica u kulturi (Jelaska, 1994).

Tijekom istraživanja dva su uzorka su bila inficirana bakterijama (Slika 21 i 22). S obzirom na učestalost inficiranja bakterijama u *in vitro* kulturi kao metodu za uklanjanje bakterijske kontaminacije iz kulture mahovine *in vitro* opisan u radu Carey i sur., (2015.) korišten je antibiotik. Kontaminirano mahovinsko tkivo ostaje u izravnom kontaktu s antibiotikom što suzbija rast bakterija, ali ne i rast mahovine. Pod uvjetom da mahovina dobije dovoljno vremena za rast. Iz agara se pojavljuju nova, nekontaminirana vlakna.

Jedan uzorak je kontaminiran plijesni, što označava ljudsku nepažnju prilikom pipremanja medija na kojem se eksplantant uzgajao ili zbog nedovoljno steriliziranog samog eksplantata (Slika 23).



Slika 22. Kontaminacija bakterijom Slika 23. Kontaminacija bakterijom  
(Izvor: foto original I. Štangl)



Slika 24. Mikroskopski prikaz kontaminacije plijesni  
(Izvor: foto original D. Bošnjak)

U istraživanju Hakam i sur. (2013.) promatrane su dvije vrste kalusa. Kalusi od nezrelih embrija su karakterizirani krem do smečkastom bojom i mekom, labavom, vodenastom prirodom; dok su kalusi zrelih embrija karakterizirani više blijedom bojom, glatki i kompaktni. Na rast kalusa utjecale su raznolikosti medija. Od četiri testirane sorte, sorta Achtar je pokazala najveći promjer kalusa za nezrele embrije. Promjer kalusa iznosi 8,39



mm, nakon pet tjedana inkubacije., zatim slijede sorte Arrehane, Marchouch i Mehdiya čiji su promjeri kalusa oko 6,5 mm. Za zrele embrije promjer kalusa sorte Achtar i Marchouch pokazali su se većim i iznosili su 6,89 mm i 6,49 mm. Dok su sorte Arrehane i Mehdiya pokazali prosječnu vrijednost oko 5,5 mm. Svi genotipovi su pokazali sve veći rast kalusa kultiviranjem eksplantata (zrelih i nezrelih embrija) na sve medije, ali u različitim razinama.

Kako bi se identificirao medij koji je najprikladniji za izazivanje razvitka kalusa i njegov razvoj, u istraživanju Jasdeep i sur. (2019.), zreli embriji su uzgojili u mediju dopunjenom sa četiri regulatora rasta: NAA, 2,4-D, BAP i Kn u različitim kombinacijama i koncentraciji. Postotak indukcije kalusa zabilježen je nakon sedam dana. Frekvencija indukcije kalusa je varirala između 30% do 80% u 9 ispitanih sorti. Podatci su izraženi u postotcima, a mediji na kojima je indukcija kalusa veća od 85,0% smatrani su dobri medijima za indukciju kalusa. Medij nazvan B<sub>15</sub> (sadrži BAP @ 1,5 mg/L), je dobar medij za indukciju kalusa za sorte DBW 14, DBW 38, HD 2967 i HD 2733 jer je inducirano 91,3-98,0% kalusa. Slično tome, medij B<sub>2</sub> (nadopunjen BAP @ 2 mg/L), pokazao se dobar za sorte DBW 38, HD 2967, HD 2733 i HD 2987 s indukcijom kalusa u rasponu od 91,7-97,7%. Za razliku od toga, kao abortivni medij za indukciju kalusa za sve testirane sorte se pokazao medij (dopunjen s NAA-om 4 mg/L), čija je indukcija bila u rasponu od 31,0 do 80,7%. Kada je uzgojenim embrijima dopušteno dulje inkubiranje (do deset dana u istom mediju), bilo je 85,0% ili više indukcije kalusa. Prema tome, mediji i kultivar utjecali su samo na raniju indukciju embrija pšenice.

U radu Mahmood i Razaaq. (2017.) istraživani su pozitivni potencijali induciranja kalusa različitih eksplantata (zreli embrij, nezreli embrij, ES zreli embrij, vršni meristem) dva genotipa pšenice, odnosno GA-2002 i AS-2002, korištenjem raznih protokola indukcije kalusa. Odgovor indukcije kalusa eksplantata GA-2002 i AS-2002 značajno su varirali između 24,92% i 84,75%. Rezultat indukcije nezrelih i zrelih embrija bio je značajno najveći u usporedbi s ostalim ispitanim eksplantatima čiji je srednji postotak indukcije od 80,21% i 78,86%. Međutim, na reakciju *in vitro* kulture eksplantata utjecali su i genotipovi i sastav medija. Nezrela kultura embrija genotipa GA-2002 pokazala je najveću indukciju kalusa (84,75%), a slijedila je kultura zrelog embrija genotipa GA-2002 (78,50%). Slično tome, nezreli embrij uzgojen na MS mediju nadopunjen sa 4 mg/L 2,4-D, a zreli embrij uzgojen na MS mediju nadopunjen sa 6 mg/L 2,4-D pokazao je najveće induktivne

sposobnosti od 90,83% i 88,33%. Naprotiv, najmanja frekvencija kalusa (10,83%) zabilježena je za vršni meristem s 2 mg/L 2,4-D.

U daljnjim istraživanjima bi se iz ovoga pokusa trebala raditi regeneracija biljaka. Regeneracija biljaka predstavlja stvaranje novih organa, embrija i čitavih biljaka, obično kao morfologeni odgovor na određeni poticaj. Regeneracija biljaka glavni je ishod kulture biljnog tkiva gdje se somatska embriogeneza i organogeneza često eksperimentiraju za regeneraciju genetski transformiranih biljaka. Proces prelaska somatskih stanica u biljne naziva se somatska ili aseksualna embriogeneza, dok se proces stvaranja organa pod utjecajem nekoliko hormona *in vitro* naziva organogeneza. Somatska embriogeneza omogućava korištenje somatskih embrija kao sintetičko sjeme, međutim primjena somatske embriogeneze nije ograničena na tehnologiju sintetičkog sjemena. Somatska embriogeneza također čini glavni dio sustava regeneracije biljaka gdje su ispitivane hibridizacija, procjena somatskih stanica, eliminacija virusa, proizvodnja metabolita i *in vitro* inicijacija mikorize (Bhatia i Bera., 2015.)

#### **4. ZAKLJUČAK**

Istraživanjem je utvrđena visoka frekvencija indukcije kalusa iz nezrelog embrija pšenice sorata Superžitarka, Srpanjka, Achat, te linija Y0758583. Frekvencije indukcije kalusa su varirale između 50% i 83%. Najveći postotak su imale sorta Achat i linija YO758583 sa 83% induciranih kalusa. Frekvencija za sortu Superžitarka je 50%, dok je za sortu Srpanjka iznosila 72%. Optimizacija pravilnog rukovanja, rad u sterilnim uvjetima, pravilna hranjiva podloga za određenu sortu, optimalni svjetlosni uvjeti, te temperatura mogu postići indukciju kalusa kroz koju je moguće u daljnjim istraživanjima raditi regeneraciju biljaka. Takve analize mogu biti od velike pomoći pri odabiru kultivara pšenice za daljnju genetsku transformaciju, te borbu protiv stresnih abiotičkih i biotičkih uvjeta.



## 5. POPIS LITERATURE

1. Amić, D. (2007.): Organska kemija za studente agronomске škole. Školska knjiga, Zagreb, 120
2. Bhatia, S., Bera, T. (2015.): Somatic Embryogenesis and organogenesis. In Modern applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences, Academic press Elsevier, 209-230
3. Carey, S.B., Payton, A.C., McDaniel, S.F. (2015.): A method for eliminating bacterial contamination from *in vitro* moss cultures. Appl Plant Sci, 3(1): 1-5
4. Bohorova, N., Fenell, S., McLean, S., Pellegrineschi, A., Hoisington. D. (1999.): Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Genetic Engineering Laboratory. Mexico D.F.: CIMMYT 7, 13
5. Fennell, S., Bohorova, N., Ginkel, M., Crossa, J., Hoisington D. (1996.): Plant regeneration from immature embryos of 48 elite CIMMYT bread wheats. Theor. Appl. Genet.( 92): 163-169.
6. Gils, M., Rubtsova, M., Kempe, K. (2012.): Split-Transgene Expression in Wheat. In: Dunwell J., Wetten A. (eds) Transgenic Plants. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 847, 123-135.
7. Hakam, N., Udupa, S., Rabha, A., Ibriz, M., Iraqi, D. (2015.): Efficient callus induction and plantlets regeneration in bread wheat immature and mature embryos. International Journal of Biotechnology Research vol.3(1): 1-9.
8. Jasdeep, P., Avijit, T., Varsha Harinder, S., Sanjay S. (2019.): Cultivar specific response of callus induction and plant regeneration from mature embryos in different elite Indian wheat. Research Journal of Biotechnology, 14(2), 1-8.
9. Jelaska, S. (1994.): Kultura biljnih stanica i tkiva. Školska knjiga, Zagreb. (5): 45, 46, 49 (6): 58, (7): 70, (9): 89, 90 (18): 212
10. Kereša, S., Barić, M., Šarčević, H., Marchetti, S. (2004.): Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos and immature

- inflorescences of eight Croatian winter wheat cultivars Die Bodenkultur 54: 155-161
11. Kovačević, V., Rastija, M. (2014.): Žitarice. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek, 47, 60
  12. Lqbal, M., Raja, N., Asif, S., Ilyas, N., Hussain, M., Yasmeen, F., Ejaz, M., Sultan, M.A., Aslam, S. (2016.): *In vitro* Study of Callogenesis and Regeneration Potential of Elite Wheat Cultivars. American Journal of Plant Sciences, 7(17), 2519-2523
  13. Mahmood I., Razzaq, A., Khan, Z.U. (2012): Evaluation of Tissue Culture Responses of Primising Wheat Cultivars and Development of Efficient Regeneration system, Pakistan Journal of Botany (44): 277-284
  14. Murashige, T., Skoog, F. (1962.): A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum (15):473-497
  15. Pierik, R.L.M. (1987.): In Vitro Culture of Higher Plants. 3<sup>rd</sup> Ed, Dordrecht ; Boston: M. Nijhoff ; Hingham, MA : Distributors for the U.S. and Canada, Kluwer, 45-82
  16. Tuskan, G.A., Mewalal, R., Gunter, L.E., Palla, K.J., Jacobson, D.A. (2018.): Defining the genetic components of callus formation: A GWAS approach. PLOS ONE 13 (8): e0202519
  17. Zhang, L.J., Seilleur, P. (1987): A simple and fast method to obtain high frequency of plant regeneration from mature and immature wheat embryos. Bull. Rech. Agron. Gembloux, 22: 187-197
  18. <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=50972> (21.8.2019.)
  19. <https://www.poljinos.hr/> (1.7.2019.)
  20. <http://www.bilje.hr/> (5.7.2019.)
  21. <https://hrcak.srce.hr/> (21.8.2019.)
  22. <http://biosorten.de> (3.9.2019.)